



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105601793 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 25

(21) 申请号 201610095951. 0

B01D 15/10(2006. 01)

(22) 申请日 2016. 02. 22

(71) 申请人 廊坊师范学院

地址 065000 河北省廊坊市安次区爱明西道
100 号

(72) 发明人 任萍 阴文强 魏龙飞

(74) 专利代理机构 北京悦成知识产权代理事务
所(普通合伙) 11527

代理人 樊耀峰

(51) Int. Cl.

C08F 220/14(2006. 01)

C08F 212/36(2006. 01)

C08F 8/32(2006. 01)

C08F 2/20(2006. 01)

B01J 20/26(2006. 01)

B01J 20/281(2006. 01)

B01J 20/30(2006. 01)

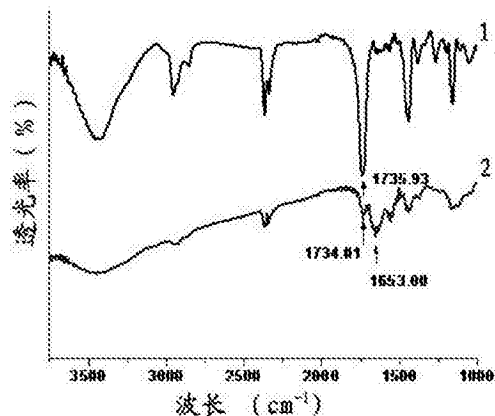
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

罗布麻黄酮纯化树脂的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种罗布麻黄酮纯化树脂的制备方法及应用。本发明的制备方法包括(1)悬浮聚合步骤、(2)胺解步骤和(3)酰胺化步骤。本发明的制备方法通过控制悬浮聚合过程中的油珠尺寸,调整升温速率,调节二乙烯苯交联剂用量、引发剂用量以及致孔剂用量,从而获得可以有效改善纯化效果、且有效去除鞣质的罗布麻黄酮纯化树脂。采用本发明的纯化树脂,可以将罗布麻提取物的总黄酮含量(采用液相色谱测定)提高至65wt%以上,鞣质含量则低于15wt%。



1. 一种罗布麻黄酮纯化树脂的制备方法,其特征在于,所述的制备方法包括如下步骤:

(1)将丙烯酸酯单体、二乙烯苯交联剂、引发剂和致孔剂混合均匀形成油相,然后将该油相加入到分散介质中,调节搅拌速度以使得分散介质中形成的油珠尺寸控制在0.4~0.8mm之间;保持该搅拌速度,并以0.1~0.6℃/min的第一速度升温至65~80℃,保持3~6小时;继续以0.1~0.6℃/min的第二速度升温至85~90℃,并保持3~6小时以形成反应产物,然后将所述的反应产物经过后处理,得到第一树脂;

其中,所述的二乙烯苯交联剂用量为丙烯酸酯单体和二乙烯苯交联剂总量的15wt%~45wt%,所述的引发剂用量为丙烯酸酯单体和二乙烯苯交联剂总量的1.1wt%~2.0wt%,所述的致孔剂用量为丙烯酸酯单体和二乙烯苯交联剂总量的101wt%~150wt%;

(2)将步骤(1)得到的第一树脂烘干,采用溶胀试剂进行溶胀5~24小时,然后与过量的胺解试剂在110~140℃下反应5~15小时,再用蒸馏水洗涤至中性,得到第二树脂;

(3)将步骤(2)得到的第二树脂与过量的醋酸酐在80~90℃下反应5~15小时,得到罗布麻黄酮纯化树脂。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:

所述的油珠尺寸控制在0.5~0.7mm之间;所述的第一速度为0.2~0.5℃/min;所述的第二速度为0.2~0.5℃/min。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:

所述的丙烯酸酯单体选自丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸丙酯、丙烯酸丁酯的一种或多种;

所述的致孔剂选自正庚烷、正辛烷、正壬烷、液体石蜡、甲苯、乙酸丁酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯中的一种或多种;

所述的引发剂选自偶氮二异丁腈ABIN、偶氮二异庚腈ABVN、过氧化苯甲酰BPO、过氧化二(2,4-二氯苯甲酰)、过氧化二乙酰、过氧化二辛酰、过氧化二月桂酰、二异丙苯过氧化物DCP或二叔丁基过氧化物DTBP中的一种或多种。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于:

所述的致孔剂选自正庚烷、质量比为1~2:1的液体石蜡与甲苯的混合物、或者质量比为1~2:1的正庚烷与乙酸丁酯的混合物。

5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:

在步骤(1)中,所述的后处理为将所述的反应产物冷却,再用50~80℃的热水洗涤,然后依次用蒸馏水、无水乙醇、丙酮洗涤和抽滤,再用石油醚作为溶剂抽提5~10小时。

6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:

在步骤(1)中,所述的分散介质选自浓度为1.0~1.5wt%的聚乙烯醇水溶液或浓度为1.0~1.5wt%的明胶水溶液;

在步骤(2)中,所述的烘干在60~75℃下进行;所述的溶胀试剂选自N,N-二甲基甲酰胺或N,N-二甲基乙酰胺;所述的胺解试剂选自二乙烯三胺、乙二胺或三乙烯四胺,所述的胺解试剂的用量为第一树脂质量的1.5~3倍;

在步骤(3)中,所述的醋酸酐的用量为第二树脂质量的2~6倍。

7. 一种罗布麻黄酮纯化树脂,其特征在于,所述的罗布麻黄酮纯化树脂通过权利要求1~6任一项所述的制备方法制备得到。

8. 根据权利要求7所述的罗布麻黄酮纯化树脂的应用, 其特征在于, 将罗布麻黄酮纯化树脂用于纯化罗布麻粗提物, 从而形成罗布麻提取物; 其中, 所述的罗布麻提取物的总黄酮含量在65wt%以上, 鞣质含量低于15wt%; 所述的总黄酮含量采用液相色谱测定。

9. 根据权利要求8所述的应用, 其特征在于, 所述的应用包括如下具体步骤:

(1') 将罗布麻粗提物分散于第一乙醇水溶液中形成吸附液, 所述吸附液中的罗布麻粗提物浓度为5~10mg/ml; 其中, 所述罗布麻粗提物的总黄酮含量低于20wt%, 鞣质含量在7wt%以上, 所述的总黄酮含量采用液相色谱测定;

(2') 将权利要求7所述的罗布麻黄酮纯化树脂装入吸附柱;

(3') 将1~2BV的所述吸附液加入步骤(2')获得的吸附柱中, 以1~2BV/h的吸附速率将所述吸附液通过所述吸附柱, 吸附完毕后, 用1~2BV的水洗涤所述吸附柱, 再用第二乙醇水溶液对所述吸附柱进行洗脱, 收集解吸液, 干燥后得到罗布麻提取物;

其中, 所述的BV表示柱体积单位。

10. 根据权利要求9所述的应用, 其特征在于, 所述的第一乙醇水溶液含有5~20vt%的乙醇; 所述吸附柱的长径比为5~20:1; 所述的第二乙醇水溶液含有60~85vt%的乙醇。

罗布麻黄酮纯化树脂的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种罗布麻黄酮纯化树脂的制备方法及应用,尤其是一种可以制备得到高纯度罗布麻黄酮的纯化树脂的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 罗布麻是夹竹桃科植物。作为一种传统中药材,罗布麻的叶子可以用于治疗高血压、心脑血管缺血等疾病。罗布麻叶中含有黄酮,有机酸及鞣质成分。由于黄酮和鞣质结构相近,通常的提取方法无法将二者分离开。

[0003] 现代化的分离纯化技术,如二氧化碳超临界萃取技术、高速逆流色谱技术、工业制备色谱技术、大孔吸附树脂技术以及微波、超声等辅助设备的开发,使得高纯度有效成分提取物的制备成为可能。

[0004] 在目前开发的分离方法中,适于大规模工业化制备的生产工艺的分离方法并不是很多。大孔树脂吸附分离法由于其低成本、无污染、操作简便、易于工业化等优势在天然植物提取分离中占据重要地位。但是,大孔吸附树脂具有广谱吸附作用,使它对某一吸附质或者对某一类吸附质的吸附选择性并不好,这导致提取物的纯度不高。例如,CN1385188A公开了一种罗布麻有效部位的提取分离方法,包含罗布麻上柱液的制备步骤、由分离柱进行分离的步骤、用洗脱剂对分离柱进行洗脱的步骤以及对洗脱液进行浓缩的步骤,其中分离柱为大孔吸附树脂柱,在洗脱步骤首先采用20-39%的乙醇水溶液洗脱,再用40-70%的乙醇水溶液洗脱。该专利文献声称可以获得总黄酮含量达到50wt%以上的浸膏。但是该方法并没有给出总黄酮含量的测试方法。CN1634325A公开了一种罗布麻提取物及其提取方法,声称其提取物中总黄酮含量35-90%。上述总黄酮含量是通过紫外光谱测定的,该方法并不适合于总黄酮含量的测定,误差非常大。本申请的发明人发现,液相色谱(HPLC)适合于总黄酮含量的测定,测定的数据较为准确。本申请的发明人也发现,上述两篇专利文献的提取物中总黄酮含量在50wt%以下。

[0005] 因此,迫切需要开发一种大孔吸附树脂,其可以将罗布麻叶中的黄酮化合物和鞣质分离。这将为罗布麻中两类物质的分离提供更经济、可大规模操作的方法。

[0006] 目前,关于中药成分常用的除鞣质方法主要有热处理冷置法、明胶沉淀法、酸性醇沉法、碱性醇沉法和铅盐沉淀法等,但是,大多方法的选择性差(廖学品等,中草药提取物中单宁(鞣质)的选择性脱除,天然产物研究与开发,第16卷第1期,第10-15页,2004年)。除鞣质方法还包括聚酰胺法,但是这种方法存在不能用于酸性环境、流速慢和混入低分子杂质等问题。因此,需要寻找一种简单且易于工业化生产的方法,其可以将黄酮纯化、并将鞣质分离出来。

发明内容

[0007] 为克服现有技术的缺陷,本申请的发明人进行了深入研究。本发明的一个目的是提供一种罗布麻黄酮纯化树脂的制备方法。该方法可以显著提高罗布麻提取物中的总黄酮

含量,且可以将罗布麻粗提物中的一部分鞣质分离出来。

[0008] 本发明的另一个目的在于提供上述制备方法获得罗布麻黄酮纯化树脂。

[0009] 本发明的再一个目的在于提供上述罗布麻黄酮纯化树脂的应用。本发明的树脂可以有效提高罗布麻叶中的总黄酮含量、并有效去除鞣质。

[0010] 本发明提供一种罗布麻黄酮纯化树脂的制备方法,包括如下步骤:

[0011] (1)将丙烯酸酯单体、二乙烯苯交联剂、引发剂和致孔剂混合均匀形成油相,然后将该油相加入到分散介质中,调节搅拌速度以使得分散介质中形成的油珠尺寸控制在0.4~0.8mm之间;保持该搅拌速度,并以0.1~0.6℃/min的第一速度升温至65~80℃,保持3~6小时;继续以0.1~0.6℃/min的第二速度升温至85~90℃,并保持3~6小时以形成反应产物,然后将所述的反应产物经过后处理,得到第一树脂;

[0012] 其中,所述的二乙烯苯交联剂用量为丙烯酸酯单体和二乙烯苯交联剂总量的15wt%~45wt%,所述的引发剂用量为丙烯酸酯单体和二乙烯苯交联剂总量的1.1wt%~2.0wt%,所述的致孔剂用量为丙烯酸酯单体和二乙烯苯交联剂总量的101wt%~150wt%;

[0013] (2)将步骤(1)得到的第一树脂烘干,然后采用溶胀试剂进行溶胀5~24小时,然后与过量的胺解试剂在110~140℃下反应5~15小时,再用蒸馏水洗涤至中性,得到第二树脂;

[0014] (3)将步骤(2)得到的第二树脂与过量的醋酸酐在80~90℃下反应5~15小时,得到罗布麻黄酮纯化树脂。

[0015] 根据本发明所述的制备方法,优选地,所述的油珠尺寸控制在0.5~0.7mm之间;所述的第一速度为0.2~0.5℃/min;所述的第二速度为0.2~0.5℃/min。

[0016] 根据本发明所述的制备方法,优选地,所述的丙烯酸酯单体选自丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸丙酯、丙烯酸丁酯的一种或多种;所述的致孔剂选自正庚烷、正辛烷、正壬烷、液体石蜡、甲苯、乙酸丁酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯中的一种或多种;所述的引发剂选自偶氮二异丁腈ABIN、偶氮二异庚腈ABVN、过氧化苯甲酰BPO、过氧化二(2,4-二氯苯甲酰)、过氧化二乙酰、过氧化二辛酰、过氧化二月桂酰、二异丙苯过氧化物DCP或二叔丁基过氧化物DTBP中的一种或多种。

[0017] 根据本发明所述的制备方法,优选地,所述的致孔剂选自正庚烷、质量比为1~2:1的液体石蜡与甲苯的混合物、或者质量比为1~2:1的正庚烷与乙酸丁酯的混合物。

[0018] 根据本发明所述的制备方法,优选地,在步骤(1)中,所述的后处理为将所述的反应产物冷却,再用50~80℃的热水洗涤,然后依次用蒸馏水、无水乙醇、丙酮洗涤和抽滤,再用石油醚作为溶剂抽提5~10小时。

[0019] 根据本发明所述的制备方法,优选地,在步骤(1)中,所述的分散介质选自浓度为1.0~1.5wt%的聚乙烯醇水溶液或浓度为1.0~1.5wt%的明胶水溶液。

[0020] 根据本发明所述的制备方法,优选地,在步骤(2)中,所述的烘干在60~75℃下进行;所述的溶胀试剂选自N,N-二甲基甲酰胺或N,N-二甲基乙酰胺;所述的胺解试剂选自二乙烯三胺、乙二胺或三乙烯四胺,所述的胺解试剂的用量为第一树脂质量的1.5~3倍。

[0021] 根据本发明所述的制备方法,优选地,在步骤(3)中,醋酸酐的用量为第二树脂质量的2~6倍。

[0022] 本发明还提供一种罗布麻黄酮纯化树脂,所述的罗布麻黄酮纯化树脂通过前述的

制备方法制备得到。

[0023] 本发明也提供上述罗布麻黄酮纯化树脂的应用,将罗布麻黄酮纯化树脂用于纯化罗布麻粗提物,从而形成罗布麻提取物;其中,所述的罗布麻提取物的总黄酮含量在65wt%以上,鞣质含量低于15wt%;所述的总黄酮含量采用液相色谱测定。

[0024] 根据本发明所述的应用,优选地,所述的应用包括如下具体步骤:

[0025] (1')将罗布麻粗提物分散于第一乙醇水溶液中形成吸附液,所述吸附液中的罗布麻粗提物浓度为5~10mg/ml;其中,所述罗布麻粗提物的总黄酮含量低于20wt%,鞣质含量在7wt%以上,所述的总黄酮含量采用液相色谱测定;

[0026] (2')将上述罗布麻黄酮纯化树脂装入吸附柱;

[0027] (3')将1~2BV的所述吸附液加入步骤(2')获得的吸附柱中,以1~2BV/h的吸附速率将所述吸附液通过所述吸附柱,吸附完毕后,用1~2BV的水洗涤所述吸附柱,再用第二乙醇水溶液对所述吸附柱进行洗脱,收集解吸液,干燥后得到罗布麻提取物;

[0028] 其中,所述的BV表示柱体积单位。

[0029] 根据本发明所述的应用,优选地,所述的第一乙醇水溶液含有5~20vt%的乙醇;所述吸附柱的长径比为5~20:1;所述的第二乙醇水溶液含有60~85vt%的乙醇。

[0030] 采用传统方法获得酰胺基树脂并不能有效地提高罗布麻提取物中的总黄酮含量。本发明的制备方法通过控制悬浮聚合过程中的油珠尺寸,调整升温速率,调节二乙烯苯交联剂用量、引发剂用量以及致孔剂用量,从而获得可以有效改善纯化效果(即有效提高罗布麻提取物中的总黄酮含量)、且有效去除鞣质的罗布麻黄酮纯化树脂。采用本发明的纯化树脂,可以将罗布麻提取物的总黄酮含量(采用液相色谱测定)提高至65wt%以上,鞣质含量则低于15wt%。

附图说明

[0031] 图1为实施例3的酯基树脂和酰胺基树脂的红外光谱图。

[0032] 图2为槲皮素和山奈酚标准品的HPLC谱图。

[0033] 图3为应用例3的罗布麻粗提物水解后的HPLC谱图。

[0034] 图4为应用例3的罗布麻提取物水解后的HPLC谱图。

具体实施方式

[0035] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明,但本发明的保护范围并不限于此。

[0036] 本发明中,“%”表示重量百分比,除非特别声明或标注。

[0037] 在本发明中,“吸附柱”、“树脂吸附柱”、“树脂柱”具有相同的含义,均表示用于吸附分离的柱子。

[0038] 在本发明中,所述的BV表示柱体积单位。

[0039] <制备方法>

[0040] 本发明的罗布麻黄酮纯化树脂的制备方法,包括(1)悬浮聚合步骤、(2)胺解步骤和(3)酰胺化步骤。

[0041] 本发明的悬浮步骤(1)为:将丙烯酸酯单体、二乙烯苯交联剂、引发剂和致孔剂混

合均匀形成油相,然后将该油相加入到分散介质中,调节搅拌速度以使得分散介质中形成的油珠尺寸控制在0.4~0.8mm之间;保持该搅拌速度,并以0.1~0.6℃/min的第一速度升温至65~80℃,保持3~6小时;继续以0.1~0.6℃/min的第二速度升温至85~90℃,并保持3~6小时以形成反应产物,然后将所述的反应产物经过后处理,得到第一树脂。

[0042] 在本发明的步骤(1)中,所述的丙烯酸酯单体可以选自丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸丙酯、丙烯酸丁酯的一种或多种;优选为丙烯酸甲酯或丙烯酸乙酯;更优选为丙烯酸甲酯。本申请的发明人发现,甲基丙烯酸甲酯等疏水性大的单体,由于胺解困难、且树脂疏水性较强,并不适合于本发明。

[0043] 在本发明的步骤(1)中,所述的二乙烯苯交联剂用量为丙烯酸酯单体和二乙烯苯交联剂总量的15wt%~45wt%,优选为20wt%~40wt%,更优选为20wt%~30wt%。本申请的发明人发现,将交联剂用量控制在合适的范围,获得的纯化树脂有利于吸附罗布麻提取物中的总黄酮。

[0044] 在本发明的步骤(1)中,所述的致孔剂可以选自正庚烷、正辛烷、正壬烷、液体石蜡、甲苯、乙酸丁酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯中的一种或多种;优选为正庚烷、液体石蜡、甲苯、乙酸丁酯的一种或多种。根据本发明的一个具体实施方式,所述的致孔剂可以选自正庚烷、质量比为1~2:1的液体石蜡与甲苯的混合物、或者质量比为1~2:1的正庚烷与乙酸丁酯的混合物;更优选为正庚烷、质量比为2:1的液体石蜡与甲苯的混合物、或者质量比为1:1的正庚烷与乙酸丁酯的混合物。在本发明中,所述的致孔剂用量为丙烯酸酯单体和二乙烯苯交联剂总量的101wt%~150wt%,优选为102wt%~130wt%,更优选为102wt%~110wt%。本申请的发明人发现,将致孔剂的用量控制在合适的范围,例如101wt%~150wt%,能保证获得纯度更高的罗布麻黄酮提取物。

[0045] 在本发明的步骤(1)中,所述的引发剂可以选自偶氮二异丁腈ABIN、偶氮二异庚腈ABVN、过氧化苯甲酰BPO、过氧化二(2,4-二氯苯甲酰)、过氧化二乙酰、过氧化二辛酰、过氧化二月桂酰、二异丙苯过氧化物DCP或二叔丁基过氧化物DTBP中的一种或多种;优选为偶氮二异丁腈ABIN、偶氮二异庚腈ABVN或过氧化苯甲酰BPO;更优选为偶氮二异丁腈ABIN。在本发明中,所述的引发剂用量可以为丙烯酸酯单体和二乙烯苯交联剂总量的1.1wt%~2.0wt%,优选为1.3wt%~1.5wt%。本申请的发明人发现,将引发剂用量控制在合适的范围,获得的纯化树脂有利于获得黄酮纯度更高的罗布麻提取物。

[0046] 在本发明的步骤(1)中,所述的分散介质可以选自浓度为1.0~1.5wt%的聚乙烯醇水溶液或浓度为1.0~1.5wt%的明胶水溶液;优选为浓度为1.0~1.5wt%的聚乙烯醇水溶液。

[0047] 根据本发明的一个优选实施方式,在本发明的步骤(1)中,以0.1~0.6℃/min的第一速度升温至70~75℃,保持4~5小时;继续以0.1~0.6℃/min的第二速度升温至85~88℃,并保持4~5小时以形成反应产物,然后将所述的反应产物经过后处理,得到第一树脂。

[0048] 在本发明的步骤(1)中,优选地,所述的油珠尺寸可以控制在0.5~0.7mm之间,更优选为0.55~0.65mm之间;所述的第一速度可以为0.2~0.5℃/min,更优选为0.4~0.5℃/min;所述的第二速度可以为0.2~0.5℃/min,更优选为0.4~0.5℃/min。本申请的发明人发现,采用上述工艺条件获得的纯化树脂,更有利于获得黄酮纯度更高的罗布麻提取物。

[0049] 在本发明的步骤(1)中,所述的后处理可以为将所述的反应产物冷却,再用50~80

℃、优选为60~70℃的热水洗涤,然后依次用蒸馏水、无水乙醇、丙酮洗涤和抽滤。更优选地,在抽滤完成之后,再用石油醚作为溶剂抽提5~10小时,优选为6~8小时。

[0050] 本发明的胺解步骤(2)为:将步骤(1)得到的第一树脂烘干,然后采用溶胀试剂进行溶胀5~24小时,然后与过量的胺解试剂在110~140℃下反应5~15小时,再用蒸馏水洗涤至中性,得到第二树脂。

[0051] 在本发明的步骤(2)中,所述的烘干可以在60~75℃、优选为65~70℃下进行。本发明的溶胀试剂可以选自N,N-二甲基甲酰胺或N,N-二甲基乙酰胺;优选为N,N-二甲基甲酰胺DMF。本发明的溶胀时间优选为10~20小时。

[0052] 在本发明的步骤(2)中,所述的胺解试剂可以选自二乙烯三胺、乙二胺或三乙烯四胺,优选为二乙烯三胺或乙二胺;更优选为二乙烯三胺。本发明的胺解试剂的用量为第一树脂质量的1.5~3倍,优选为2~2.5倍。步骤(2)中的反应温度优选为120~130℃,反应时间优选为8~12小时,更优选为9~10小时。

[0053] 本发明的酰胺化步骤(3)为:将步骤(2)得到的第二树脂与过量的醋酸酐在80~90℃下反应5~15小时,得到罗布麻黄酮纯化树脂。

[0054] 在本发明的步骤(3)中,醋酸酐的用量为第二树脂质量的2~6倍,优选为3~5倍。步骤(3)的反应温度优选为85~88℃;反应时间优选为8~12小时,更优选为9~10小时。

[0055] <纯化树脂>

[0056] 本发明的罗布麻黄酮纯化树脂通过前述的制备方法制备得到。本发明的纯化树脂为带有酰胺基的分离树脂。本发明的纯化树脂的形状为球形;粒径为0.3~1.0mm,优选为0.4~0.8mm;比表面积为70~150m²/g干树脂,优选为80~130m²/g干树脂;含水量为60~70%,优选为62~65%;平均孔径为10~30nm,优选为15~25nm。

[0057] <纯化树脂的应用>

[0058] 本发明的上述罗布麻黄酮纯化树脂的应用为:将所述罗布麻黄酮纯化树脂用于纯化罗布麻粗提物,从而形成罗布麻提取物。在本发明中,罗布麻粗提物与罗布麻提取物具有不同的含义,根据总黄酮含量的不同而区别。在本发明中,罗布麻粗提物的总黄酮含量低于20wt%,鞣质含量在7wt%以上;罗布麻提取物的总黄酮含量在65wt%以上,鞣质含量低于15wt%。本发明的总黄酮含量采用液相色谱测定,以保证测试数据的准确性。本发明的总黄酮含量的详细测试条件参见下文。

[0059] 在本发明中,将罗布麻黄酮纯化树脂用于纯化罗布麻粗提物优选包括吸附液制备步骤(1');装柱步骤(2');吸附分离步骤(3')。在本发明中,步骤(1')、(2')的顺序并没有特别限制,可以按照步骤(1')和(2')的顺序进行,也可以按照步骤(2')和(1')的顺序进行。

[0060] 本发明的步骤(1')为:将罗布麻粗提物分散于第一乙醇水溶液中形成吸附液,所述吸附液中的罗布麻粗提物浓度为5~10mg/ml。

[0061] 在本发明的步骤(1')中,所述的第一乙醇水溶液含有5~20vt%、优选为8~18vt%、更优选为10~15vt%的乙醇。第一乙醇水溶液用于将罗布麻粗提物分散,并溶解其中的黄酮组分。作为优选,本发明吸附液中的罗布麻粗提物浓度可以为6~8mg/ml。

[0062] 本发明的步骤(2')为:将上述罗布麻黄酮纯化树脂装入吸附柱。所述吸附柱的长径比(柱长/柱直径)为5~20:1,优选为10~15:1。这样可以保证吸附分离效果,提高提取物中的黄酮含量。

[0063] 本发明的步骤(3')为:将1~2BV的所述吸附液加入步骤(2')获得的吸附柱中,以1~2BV/h的吸附速率将所述吸附液通过所述吸附柱,从而形成流出液;吸附完毕后,用1~2BV的水洗涤所述吸附柱,再用第二乙醇水溶液对所述吸附柱进行洗脱,收集解吸液,干燥后得到罗布麻提取物。通过控制吸附速率,可以进一步提高罗布麻提取物中总黄酮含量,同时避免其损失。将上述步骤获得的流出液进行检测,得到几乎不含黄酮的鞣质样品,这进一步证明总黄酮的损失很少,且鞣质得到有效去除。

[0064] 在本发明的步骤(3')中,所述的第二乙醇水溶液含有60~85vt%、优选为70~80vt%的乙醇。根据本发明的一个具体实施方式,将1.5~2BV的所述吸附液加入步骤(2')获得的吸附柱中,以1~1.5BV/h的吸附速率将所述吸附液通过所述吸附柱,吸附完毕后,用1~1.5BV的水洗涤所述吸附柱,再用第二乙醇水溶液对所述吸附柱进行洗脱,收集解吸液,干燥后得到罗布麻提取物。

[0065] 下面将详细描述本发明实施例中所使用的测试方法:

[0066] <测试方法说明>

[0067] 1、树脂的含水率测定

[0068] 准确称取一定量树脂干球置于称量瓶中,置于110℃烘箱中烘干4h,取出后置于干燥器中冷却,冷却后称重。用以下公式计算树脂的含水率:

[0069] $x = (w_2 - w_3) / (w_2 - w_1) \times 100\%$

[0070] 式中:x为含水率,w1为称量瓶的重量,w2为称量瓶和试样重量,w3为称量瓶和干燥后试样的重量。

[0071] 2、树脂的红外光谱测定

[0072] 将树脂样品在110℃下烘干、研碎,取2~3mg研碎的树脂样品与200~300mg干燥的KBr粉末在玛瑙研钵中混匀,充分研细至颗粒直径小于2μm,用不锈钢铲取70~90mg放入压片模具内,在压片机上用 $5 \sim 10 \times 10^7$ Pa压力压成透明薄片,然后在傅里叶变换红外光谱仪(IRPrestige-21/FTIR-8400S,日本岛津公司生产)上测定。

[0073] 3、树脂的比表面积及孔径测定

[0074] 将树脂样品在80℃下烘干至恒重,置于干燥器中备用。准确称取0.3g树脂样品用SSA-4200孔径及比表面积分析仪(北京彼奥德电子技术有限公司)进行比表面积和孔径分析。

[0075] 4、罗布麻黄酮的液相色谱(HPLC)的测定

[0076] a. 对照品溶液的制备

[0077] 精密称取槲皮素对照品5.4mg,山奈酚对照品3.7mg置于同一50ml量瓶中,加80%甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得混合对照品储备液(槲皮素浓度为 $108\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,山奈酚浓度为 $74\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

[0078] b. 样品溶液制备

[0079] 取适量罗布麻粗提取液,将体积比为20:3的罗布麻粗提取液与浓盐酸加入锥形瓶中,于恒温水浴锅中90℃水浴中加热回流2h,取出,冷却后,转移至容量瓶中,用70%乙醇定容至刻度,摇匀,过0.45μm微孔滤膜,用HPLC法测得其总黄酮含量。

[0080] c. 液相色谱(HPLC)条件

[0081] 采用高效液相色谱仪(Agilent-1260美国安捷伦科技有限公司生产)进行液相色谱

谱操作。使用Aglient-1260紫外检测器和反相AglientC18(15 μ m,150mm $\times$ 4.6mmI.D)色谱柱。流动相:甲醇-0.4%磷酸溶液(体积比为50:50),检测波长为360nm,柱温25 $^{\circ}$ C,流速为1.0ml $\cdot$ min $^{-1}$,进样量10 μ l。

[0082] 在上述条件下,槲皮素与山奈酚能与其他成分达到较好的分离,且理论塔板数均不低于3000。

[0083] 槲皮素与山奈酚标准品、罗布麻粗提物水解后的、罗布麻提取物水解后的HPLC谱图参见图2-4。

[0084] d.罗布麻叶的总黄酮含量的计算

[0085] 罗布麻叶中的黄酮苷水解后的绝大部分成为槲皮素和山奈酚。根据HPLC法测得的槲皮素和山奈酚峰面积计算槲皮素和山奈酚的含量。将6-O-乙酰基异槲皮苷的分子量(505.4)和6-O-乙酰基黄芪苷的分子量(490.4)相加之和除以2,得到平均分子量为497.9的黄酮醇乙酸酯苷作为总的罗布麻叶黄酮醇苷的代表。根据苷元槲皮素的分子量(302.23)和山奈酚的分子量(286.23)计算出黄酮醇乙酸酯苷对槲皮素和山奈酚的转换因子分别为1.65和1.74,再根据下式计算罗布麻叶中总黄酮醇苷的含量。(光琴、周亚球,HPLC测定罗布麻叶中总黄酮的含量,中国实验方剂学杂志,第17卷第6期,第103-106页,2011年)

[0086] 罗布麻叶总黄酮醇苷含量=槲皮素含量 $\times$ 1.65+山奈酚含量 $\times$ 1.74

[0087] e.总黄酮化合物的纯度的计算

[0088] 纯度 $P = \frac{M_e}{M_{\text{烘干}}} \times 100\%$

[0089] $M_{\text{烘干}}$:溶液烘干后质量(mg);

[0090] M_e :溶液中总黄酮质量(mg)。

[0091] 5、罗布麻中鞣质的测定(樊珍珍等,正交试验优选罗布麻叶中总鞣质提取工艺,中国实验方剂学杂志,第19期第7期,第13-16页,2013年)

[0092] a.磷钼钨酸试剂的配制

[0093] 取钨酸钠100g,钼酸钠25g,加水700ml使其溶解,加盐酸100ml,磷酸50ml,加热回流10h,放置冷却,再加硫酸锂150g、水50ml和溴0.2ml,煮沸除去残留的溴(约15min)。冷却,加水稀释至1000ml后滤过即得。本液不得显绿色;如放置后变为绿色,可加溴0.2ml,煮沸除去多余的溴即可。

[0094] b.对照品溶液的制备

[0095] 精密称取没食子酸对照品25mg,置于50ml棕色容量瓶中,加水溶解,定容至刻度,精密量取5ml,置于25ml棕色容量瓶中加水至刻度,摇匀,即得。

[0096] c.标准曲线的测定

[0097] 精密量取对照品溶液0.25、0.5、1、1.5、2、2.5ml,分别置于25ml棕色容量瓶中,分别加磷钼钨酸试液1ml,依次精密加20wt%碳酸钠溶液12ml,加水稀释至刻度,摇匀,放置30min:,以水为空白,于760nm处测定吸光度(A),以A为纵坐标,质量浓度为横坐标,测得对照品的回归线方程,即为标准曲线。

[0098] d.总酚含量

[0099] 精密量取供试品溶液0.2ml,置于25ml棕色容量瓶中,按方法a~c测定吸光度,利

用标准曲线计算其质量浓度。

[0100] e. 不被吸附的多酚含量

[0101] 精密量取供试品溶液25ml,加入至已有干酪素0.6g的100ml具塞锥形瓶中,密塞,置于30℃水浴中保温1h,时时振摇,取出,放冷,摇匀,过滤弃掉初滤液,取续滤液0.2ml置25ml棕色量瓶中,按方法a~c测定吸光度,利用标准曲线计算其质量浓度。

[0102] f. 鞣质的计算方法

[0103] 通过测定对照品的吸光度,得出标准曲线。再分别测定干酪素吸附前后样品的吸光度,将测定的吸光度A代入标准曲线中得出该溶液中的酚类化合物的浓度C。

[0104] 鞣质含量=总酚量-不被吸附多酚含量

[0105] 以下实施例的原料说明如下:

[0106] 液体石蜡,分析纯,沈阳市新西试剂厂;

[0107] 二乙烯苯为工业品,纯度为50%。

[0108] 其他原料均为市售常规产品。

[0109] 实施例1

[0110] 将聚乙烯醇溶解于水中,配成质量百分数为1%的聚乙烯醇水溶液。将240g聚乙烯醇水溶液置于500ml三口瓶中,水浴加热至40℃;以28g丙烯酸甲酯为单体、12g二乙烯苯为交联剂,以42g甲苯和液蜡作为致孔剂(甲苯:液蜡=2:1,质量比)、以0.6g偶氮二异丁腈为引发剂,将上述物质混合均匀后加入三口瓶中,开动搅拌,调节油珠尺寸在0.5~0.7mm之间,经悬浮聚合,以0.5℃/min的升温速度缓慢升温至65℃反应4小时,再继续以0.5℃/min的升温速度缓慢升温至85℃反应4小时,停止反应得到反应产物。将反应产物冷却,再用60℃的热水洗涤,然后依次用蒸馏水、无水乙醇、丙酮洗涤和抽滤,再用石油醚作为溶剂抽提8小时,得到酯基树脂,即第一树脂。

[0111] 将50g上述酯基树脂(60℃烘干后)加入500ml三口瓶中,以300ml的N,N-二甲基甲酰胺充分溶胀,加入100g二乙烯三胺,搅拌均匀后,升温至130℃反应10小时,反应完成后,经过洗涤处理后得到胺基树脂,即第二树脂。

[0112] 将50g上述胺基树脂加入500ml三口瓶中,再加入200ml醋酸酐,在80℃反应9小时,经过洗涤处理后得到酰胺基树脂,即罗布麻黄酮纯化树脂。

[0113] 酰胺基树脂的外观特征和结构参数为:树脂为球形,粒径0.4mm,比表面积为100m²/g干树脂,含水量为60%,平均孔径为20nm。

[0114] 实施例2

[0115] 将聚乙烯醇溶解于水中配成质量百分数为1%的聚乙烯醇水溶液。将240g聚乙烯醇水溶液加入500ml三口瓶中,水浴加热至40℃;以24g丙烯酸甲酯为单体、16g二乙烯苯为交联剂,以41g正庚烷和乙酸丁酯作为致孔剂(正庚烷:乙酸丁酯=1:1,质量比)、以0.6g偶氮二异丁腈为引发剂,将上述物质混合均匀后加入三口瓶中,开动搅拌,调节油珠尺寸在0.5~0.7mm之间,以0.5℃/min的升温速度缓慢升温至67℃反应4小时,再继续以0.6℃/min的升温速度缓慢升温至85℃反应4小时,停止反应得到反应产物。将反应产物冷却,再用60℃的热水洗涤,然后依次用蒸馏水、无水乙醇、丙酮洗涤和抽滤,再用石油醚作为溶剂抽提8小时,得到酯基树脂,即第一树脂。

[0116] 将50g上述酯基树脂(60℃烘干后)加入500ml三口瓶中,以300ml N,N-二甲基甲酰

胺充分溶胀,加入100g二乙烯三胺,搅拌均匀后,升温至130℃反应9小时,反应完成后,经过洗涤处理后得到胺基树脂,即第二树脂。

[0117] 将50g上述胺基树脂加入500ml三口瓶中,再加入200ml醋酸酐,在80℃反应10小时,经过洗涤处理后得到酰胺基树脂,即罗布麻黄酮纯化树脂。

[0118] 酰胺基树脂的外观特征和结构参数为:树脂为球形,粒径0.4mm,比表面积为120m²/g干树脂,含水量为60%,平均孔径为20nm。

[0119] 实施例3

[0120] 将聚乙烯醇溶解于水中配成质量百分数为1%的聚乙烯醇水溶液。将240g聚乙烯醇水溶液加入500ml三口瓶中,水浴加热至40℃;以32g丙烯酸甲酯为单体、8g二乙烯苯为交联剂,以42g正庚烷作为致孔剂、以0.6g偶氮二异丁腈为引发剂,将上述物质混合均匀后加入三口瓶中,开动搅拌,调节油珠尺寸在0.5~0.7mm之间,经悬浮聚合,以0.5℃/min的升温速度缓慢升温至67℃反应4小时,再继续以0.5℃/min的升温速度缓慢升温至85℃反应4小时,停止反应反应产物。将反应产物冷却,再用60℃的热水洗涤,然后依次用蒸馏水、无水乙醇、丙酮洗涤和抽滤,再用石油醚作为溶剂抽提8小时,得到酯基树脂,即第一树脂。

[0121] 将50g上述酯基树脂(60℃烘干后)加入500ml三口瓶中,以300ml的N,N-二甲基甲酰胺充分溶胀,加入100g二乙烯三胺,搅拌均匀后,升温至130℃反应10小时,反应完成后,经过洗涤处理后得到胺基树脂,即第二树脂。

[0122] 将50g上述胺基树脂加入500ml三口瓶中,再加入200ml醋酸酐,在80℃反应10小时,经过洗涤处理后得到酰胺基树脂,即罗布麻黄酮纯化树脂。

[0123] 酰胺基树脂的外观特征和结构参数为:树脂为球形,粒径0.4mm,比表面积为80m²/g干树脂,含水量为60%,平均孔径为25nm。

[0124] 实施例3的酯基树脂和酰胺基树脂的红外光谱图参见图1。其中,1为酯基树脂的红外光谱图,2为酰胺基树脂的红外光谱图。酯基树脂中的酯羰基C=O的伸缩振动峰在1735.93cm⁻¹附近,经过酰胺化后的树脂在此处(1734.01cm⁻¹)的吸收明显减弱,而且出现了吸收更强的峰(1653.00cm⁻¹),为酰胺基上羰基C=O的伸缩振动吸收峰。

[0125] 应用例1~3

[0126] 1. 罗布麻粗提物的制备

[0127] 将罗布麻叶用粉碎机粉碎,过40目筛,称取30g粉碎的罗布麻,用900ml的70vt%乙醇水溶液分三次回流提取,70℃加热回流,每次2小时,三次所得滤液合并得到粗提取液。

[0128] 将粗提取液用旋转蒸发仪进行旋蒸,在蒸出乙醇的同时补加水,旋蒸至溶液中乙醇含量为5-20vt%。将得到的溶液进行抽滤,即得吸附溶液。

[0129] 将商品化树脂HPD-100型大孔吸附树脂装柱(长径比为6:1)后加入上柱液,将上柱液以1BV/h的吸附速率通过树脂柱,吸附完毕用1BV水洗,再加入2BV的80vt%的乙醇水溶液,将吸附在树脂上的物质洗脱下来,收集解吸液。65℃真空干燥得到罗布麻粗提物(固体粉末),经测定其中黄酮含量为14.5wt%,鞣质含量为9.7wt%。水解后的HPLC谱图参见图3(水解条件参见前文)。

[0130] 2. 罗布麻提取物的制备

[0131] 将黄酮含量14.5wt%、鞣质含量9.7wt%的罗布麻粗提物溶解在15vt%乙醇水溶液中,制得上柱液,上柱液浓度为10mg/ml。

[0132] 分别将实施例1~3的酰胺基树脂装入吸附柱中,吸附柱的长径比为20:1。

[0133] 在室温下,将2BV的上柱液加入吸附柱,以1.0BV/h的流速通过吸附柱,其中的黄酮化合物被吸附在吸附柱上,而同时部分鞣质从吸附柱上流出。经检测,流出液中得到几乎不含黄酮的鞣质样品。

[0134] 以70vt%乙醇溶液洗脱吸附柱,树脂得以再生,同时将洗脱液(解吸液)回收,真空干燥后得到罗布麻提取物。水解后的HPLC谱图参见图4(水解条件参见前文)。总黄酮含量与鞣质含量参见表1。

[0135] 对比应用例1~2

[0136] 分别作为对比应用例1和2,CN1385188A的实施例2和CN1634325A的实施例2的方法获得罗布麻提取物,采用本发明的测试方法测定总黄酮含量。

[0137] 表1

[0138]

编号	酰胺基树脂	罗布麻提取物的 总黄酮含量 (wt%)	罗布麻提取物的 鞣质含量 (wt%)	流出液的黄酮 含量
应用例 1	实施例 1	70	8	几乎不含
应用例 2	实施例 2	67	14	几乎不含
应用例 3	实施例 3	80	12	几乎不含
对比应用例 1	—	<30	20	—
对比应用例 2	—	<35	19	—

[0139] 本发明并不限于上述实施方式,在不背离本发明的实质内容的前提下,本领域技术人员可以想到的任何变形、改进、替换均落入本发明的范围。

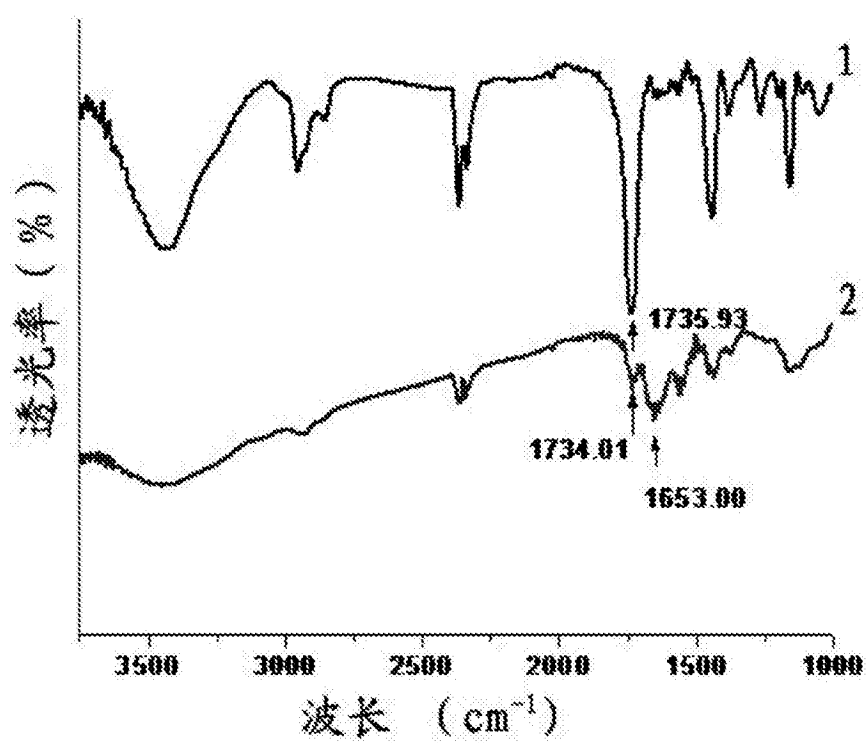


图1

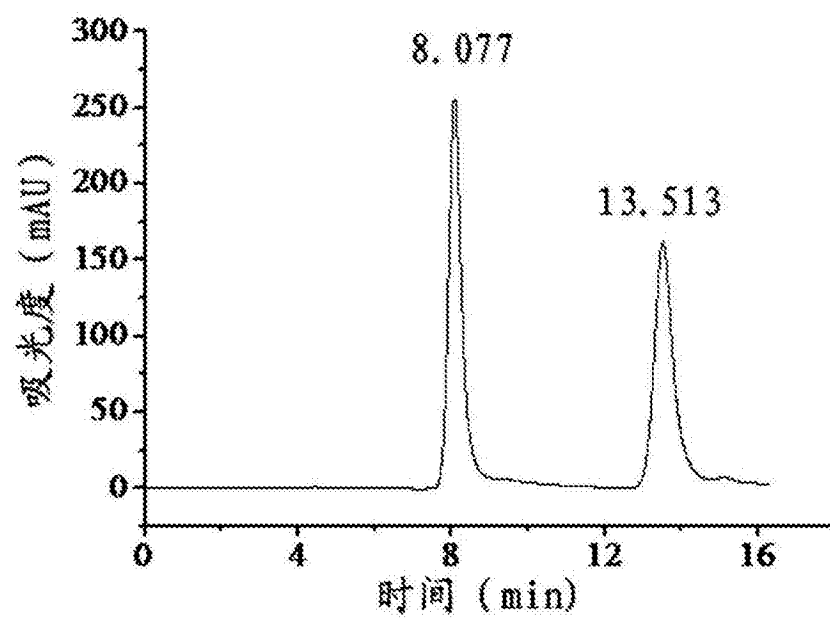


图2

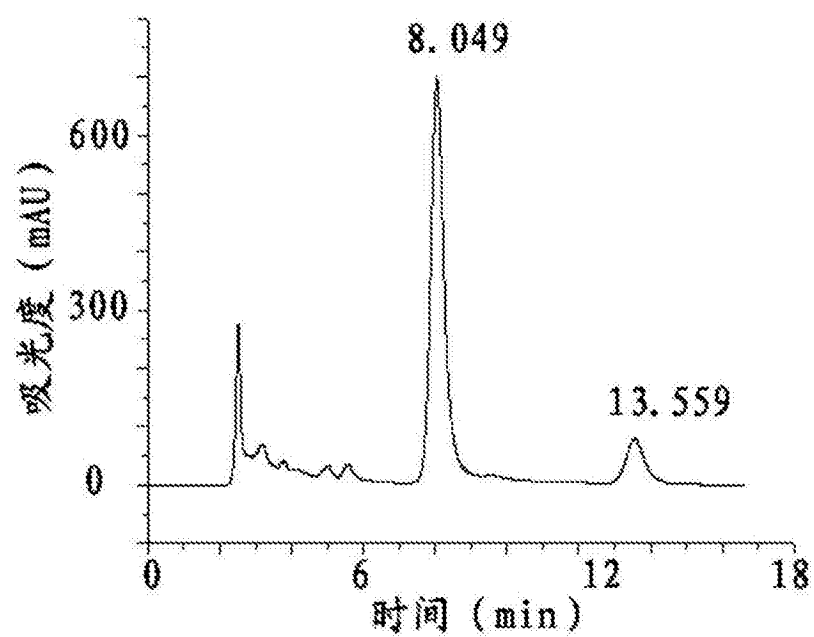


图3

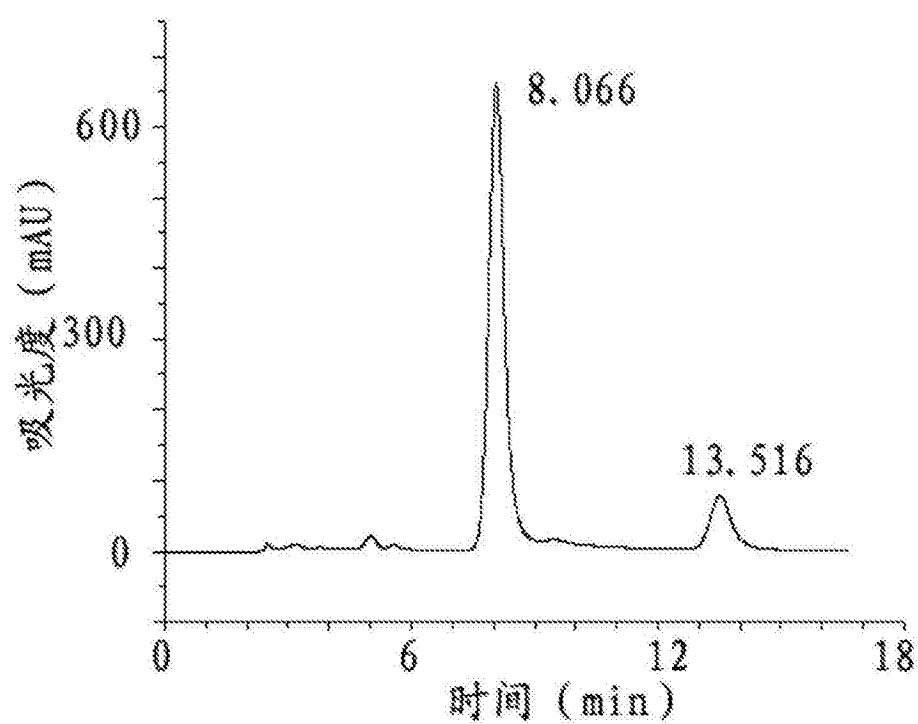


图4